УДК 619:616.98:578.835.2:615.371:515-078

Кременчугская С.Р., Гуленкин В.М.
(Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных»)

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРОТИВОЯЩУРНОГО ИММУНИТЕТА У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ ВАКЦИНАМИ С РАЗЛИЧНЫМИ АДЪЮВАНТАМИ

Ключевые слова: профилактическая вакцинация, иммунитет, иммунизация, телята, крупный рогатый скот

Введение

Важная роль в борьбе с ящуром отводится профилактической вакцинации, обеспечивающей иммунитет в популяции восприимчивых животных. Наиболее часто для вакцинации используются сорбированные гидроокисьалюминиевые и эмульсионные вакцины. Существенным недостатком противоящурных сорбированных вакцин является индукция непродолжительного иммунитета и в связи с этим необходимость повторного введения препарата. Эмульсионные вакцины обеспечивают постепенное поступление антигена в организм животного, тем самым создавая более длительную защиту (5, 4, 2). Динамику накопления титров антител после применения сорбированных и эмульсионных вакцин изучают в РН и ИФА (3, 1).

Целью нашей работы являлась оценка антигенной активности вакцин на основе различных адъювантов по титрам антител в сыворотках крови иммунизированного крупного рогатого скота (КРС) в реакции микронейтрализации (РМН).

Материалы и методы

Вакцины. Для иммунизации животных применяли культуральные инактивированные моновалентные вакцины из штамма вируса ящура А/Киргизия/07 с различными адъювантами.

Сорбированная и сорбированная универсальная вакцины на основе двух адъювантов - гидроокиси алюминия и сапонина содержали по 6 мкг и 30 мкг иммунизирующего компонента в прививной дозе соответственно.

Эмульсионные вакцины с типами эмульсий вода-масло и вода-масло-вода на основе адъювантов Montanide ISA 70 и Montanide ISA 206 соответственно содержали по 6 мкг иммунизирующего компонента в прививной дозе.

Животные. В опытах были использованы 17 голов молодняка КРС, доставленные в ФГУ «ВНИИЗЖ» из буферной зоны РФ, где проводится систематическая профилактическая вакцинация против ящура, а также 20 голов взрослого КРС не вакцинированного против ящура. Для проведения экспериментов обе партии животных были разделены на 4 группы по 4 - 5 голов в каждой.

Вакцинация и контрольное заражение. Взрослых животных и молодняк каждой из 4 групп иммунизировали против ящура вакцинами из штамма А/Киргизия/07:

1-ая группа – вакцина сорбированная;

2-ая группа – вакцина сорбированная универсальная;

3-ья группа – вакцина эмульсионная (адъювант Montanide ISA 70);

4-ая группа – вакцина эмульсионная (адъювант Montanide ISA 206).

Через 28 суток после иммунизации молодняка и 91 сутки после иммунизации взрослых животных проводили контрольное заражение путем интрадермалингвального ведения афтозного вируса ящура КРС А/Турция/06 в дозе 104 ИД50/0,1 мл. Результаты контрольного заражения учитывали через 7 суток.

Сбор образцов. От животных после вакцинации еженедельно отбирали образцы крови. Для получения сыворотки крови образцы выдерживали в термостате при температуре 370С в течение 1 ч и оставляли на 16-18 ч в холодильнике при температуре 40С. Сыворотку крови отделяли от сгустка центрифугированием при 1000 об/ми в течение 15 мин. Полученные образцы сыворотки крови хранили при температуре минус 200С до использования.

Серологические исследования. Титры вируснейтрализующих антител в образцах сывороток крови КРС определяли в реак-

ции микронейтрализации (РМН) в 96-луночных культуральных планшетах фирмы “Costar” против 100 ТЦД50 вируса ящура типа А/Киргизия/07. Конечную точку титра антител рассчитывали как конечное разведение сыворотки, нейтрализующее 100 ТЦД50 гомологичного вируса в 50% лунок.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы «STATISTICA 6». Оценку уровня значимости (величина p) различия средних титров антител оценивали по t – критерию (распределение Стьюдента) для двух независимых выборок в случае их нормального распределения и по непараметрическому критерию (U-критерию Манна-Уитни), когда распределение отличалось от нормального. В случае получения уровня значимости $p \geq 0,05$ (вероятности ошибочно отклонить нулевую гипотезу H0: $\mu 2=\mu 2$ – генеральные средние в первой и второй выборке равны между собой или «отсутствие различия средних двух выборок»), средние значения выборок считали достоверно неразличимыми, а при $p<0,05$ – достоверно различимыми (нулевая гипотеза отвергается) при доверительной вероятности $P=0,95$.

Результаты исследований

Изучение иммунного ответа на вакцинацию у телят. Из суммированных в табл. 1 результатов следует, что средний титр антител в РМН в сыворотке крови телят через 21 – 28 суток после иммунизации эмульсионной вакциной с адъювантом Montanide ISA 70 составлял 1:896 и превышал средние титры антител у животных, иммунизированных вакцинами на основе других адъювантов в 3,5 – 5,9 раза.

Результаты сравнительного анализа динамики накопления уровня противоящурных антител в крови вакцинированных телят в РМН представлены в табл. 2. Показано, что на 21 - 28 сутки имеется существенная достоверность различия средних титров антител после иммунизации животных вакциной на основе масляного адъюванта Montanide ISA 70 по сравнению с титрами антител, полученными на введение сорбированной, сорбированной универсальной и вакцины на основе масляного адъюванта Montanide ISA 206.

Следует отметить, что динамика накопления противоящурных антител в крови телят через 7 и 14 суток после иммунизации существенно не отличалась в зависимости от типа вводимой вакцины. Кроме того, за период наблюдения не выявлены различия в титрах антител в сыворотках крови животных при иммунизации сорбированной, сорбированной универсальной вакцинами и эмульсионной вакциной на основе адъюванта Montanide ISA 206. Также не установлено существенного различия в титрах антител при использовании для иммунизации телят сорбированной универсальной вакцины и эмульсионной вакцины на основе адъюванта Montanide ISA 206.

Изучение иммунного ответа на вакцинацию у взрослого КРС. Представленные в табл. 3 и 4 результаты указывают на тот факт, что, начиная с 14 суток после иммунизации взрослого КРС, эмульсионная вакцина на основе масляного адъюванта Montanide ISA 70 вызывает образование антител в наиболее высоких титрах по сравнению с другими вакцинами. При этом средние титры антител в РМН, начиная с 21 суток после вакцинации, достоверно отличаются от титров антител, полученных при использовании сорбированной вакцины, а с 35 суток - сорбированной универсальной вакцины. Исключением являются титры антител у животных на 35 - 42 сутки после применения эмульсионной вакцины на основе адъюванта Montanide ISA 70 по отношению к таковым после иммунизации эмульсионной вакциной на основе адъюванта Montanide ISA 206.

В группе из 5 животных, иммунизированных эмульсионной вакциной на основе масляного адъюванта Montanide ISA 70, одна голова КРС с инвентарным № 8747 не выдержала контрольного заражения. В сыворотке крови этого животного было отмечено снижение титра антител с 1:512 на 63 сутки после вакцинации до 1:32 при контрольном заражении на 91 сутки.

Эмульсионная вакцина на основе адъюванта Montanide ISA 206, начиная с 35 суток после иммунизации КРС, показала более высокие результаты по накоплению антител в сыворотке крови по сравнению с сорбированной и сорбированной универсальной вакцинами. При этом все животные этой группы были устойчивы к ящурной инфекции.

Существенного различия в титрах антител при использовании сорбированной и сорбированной универсальной вакцин не было выявлено. Однако при контрольном заражении вирусом ящура А/Турция/06 в группе КРС, иммунизированных сорбированной вакциной, только одно животное с инвентарным № 8806 противостояло генерализованной форме инфекции, что кор-

Таблица 1

Уровень титров антител в РМН в крови телят, иммунизированных вакцинами из штамма вируса ящура А/Киргизия/07

Тип вакцины	№ животных (телята)	Титр антител в РМН (обратная величина разведений), сутки после вакцинации		
		7	**14**	**21 - 28**
Сорбированная	4718	32	128	192/ 96
	4720	24	128	512/ 128
	4746	32	128	384/ 96
	4752	64	64	512/ 96
	M±m	**38,0±8,9**	**112,0±16,0**	**252,0±66,1**
Эмульсионная Montanide ISA 70	4768	48	128	384/256
	4769	16	96	1024/ 768
	4778	48	192	1536
	4780	24	64	768/1024
	M±m	**34,0±8,2**	**120,0±27,3**	**896,0±191,5**
Эмульсионная Montanide ISA 206	4783	96	96	48/ 48
	4785	48	128	384/ 64
	4789	16	128	64
	4792	32	128	256/384
	M±m	**48,0±17,3**	**120,0±8,0**	**178,3±59,9**
Сорбированная универсальная	4793	48	64	256/ 96
	4964	48	128	384/ 256
	4966	48	96	48/ 64
	4967	32	48	24/192
	4968	32	96	128/ 64
	M±m	**41,6±3,9**	**86,4±13,9**	**151,2±37,0**

Таблица 2

Оценка статистической достоверности различия уровня антител в РМН после иммунизации телят вакцинами из штамма вируса ящура А/Киргизия/07 на основе различных адъювантов

Сравниваемые вакцины	Значения величины р, сутки после вакцинации		
	7	**14**	**21-28**
Сорбированная и эмульсионная Montanide ISA 70	>0,75	>0,80	**<0,006**
Сорбированная и эмульсионная Montanide ISA 206	>0,62	>0,67	>0,42
Сорбированная и сорбированная универсальная	>0,70	>0,26	>0,18
Эмульсионная Montanide ISA 70 и эмульсионная Montanide ISA 206	>0,49	1,0	**<0,004**
Эмульсионная Montanide ISA 70 и сорбированная универсальная	>0,40	>0,28	**<0,0004**
Эмульсионная Montanide ISA 206 и сорбированная универсальная	>0,69	>0,09	>0,69

Примечание: при р≥0,05 - средние значения титров антител достоверно неразличимы;

при р<0,05 – средние значения титров антител достоверно различимы

релирует с результатами серологических исследований в РМН: Титры антител в сыворотке крови этого животного с 28 суток по 91 сутки были максимальными по сравнению с титрами антител животных данной группы. Тогда как в группе КРС, которому вводили сорбированную универсальную вакцину, только у одного животного с инвентарным № 8804 были выявлены признаки генерализации после контрольного заражения. Титры антител в сыворотке крови этого животного с 7 по 21 сутки и с 49 по 91 сутки после вакцинации были ниже средних титров антител у животных этой группы и в момент контрольного заражения составили 1:64.

Таблица 3

Уровень титров антител в РМН в крови взрослого КРС, иммунизированного вакцинами из штамма вируса ящура А/Киргизия/07

Тип вакцины	№ животных (бычки)	Титр антител в РМН (обратная величина разведений), сутки после вакцинации						
		7	**14**	**21 - 28**	**35 - 42**	**49 - 56**	**63 - 70**	**77 - 91**
Сорбированная	8765	н/и	96	128/48	64/64	96/32	96/32	64/128/48
	8769	16	128	256/64	96/64	48/64	128/48	64/128/64
	8806	32	128	256/256	192/96	128/192	128/128	128/512/512
	8807	24	64	128/32	48/64	32/64	128/64	48/96/96
	8808	32	96	192/64	256/64	64/64	96/48	64/96/64
	M±m	**26,0±3,8**	**102,4±12,0**	**142,4±28,9**	**100,8±21,6**	**78,4±15,5**	**89,6±12,2**	**132,8±43,2**
Эмульсионная Montanide ISA 70	8742	48	192	2048/1024	256/768	1024/512	1536/1536	512/1536/3072
	8744	16	64	512/128	198/192	512/512	768/768	н/и
	8747	16	64	96/128	256/96	64/384	512/48	32/48/32
	8748	16	192	1536/384	384/192	256/768	768/512	1024/1536/2048
	8749	24	128	192/64	64/128	384/768	1536/768	1024/1536/1024
	M±m	**24,0±6,2**	**128,0±28,7**	**611,2±220,1**	**253,4±64,0**	**518,4±87,7**	**875,2±160,0**	**906,0±226,5**
Эмульсионная Montanide ISA 206	8775	16	96	64/96	256/768	512/256	768/256	512/512/512
	8776	32	96	512/128	256/384	384/512	512/256	512/768/1536
	8779	48	128	64/198	768/256	384/256	768/128	512/128/1024
	8780	24	128	128/128	256/128	96/256	192/96	768/768/192
	8781	16	16	16/16	32/16	48/32	24/48	64/192/192
	M±m	**27,2±6,0**	**92,8±20,6**	**135,0±45,5**	**312,0±83,9**	**273,6±55,8**	**304,8±88,8**	**473,6±83,8**
Сорбированная универсальная	8801	16	96	256/128	128/32	96/128	192/64	96/192/192
	8802	96	192	512/96	192/64	192/192	256/64	192/512/384
	8803	24	128	256/192	96/96	128/128	192/64	192/256/48
	8804	16	64	128/192	96/96	64/64	64/64	48/64/48
	8805	32	128	256/128	128/32	48/64	64/24	64/128/128
	M±m	**36,8±15,1**	**121,6±21,3**	**214,4±38,2**	**96,0±15,1**	**110,4±16,6**	**104,8±24,6**	**169,6±34,4**

Таблица 4

Оценка статистической достоверности различия уровня антител в РМН после иммунизации взрослого КРС вакцинами из штамма вируса ящура А/Киргизия/07 на основе различных адъювантов

Сравниваемые Вакцины	Значения величины p, сутки после вакцинации						
	7	14	21-28	35-42	49-56	63-70	77-91
Сорбированная и эмульсионная Montanide ISA 70	>0,80	>0,43	**<0,05**	**<0,04**	**<0,00011**	**<0,00012**	**<0,002**
Сорбированная и эмульсионная Montanide ISA 206	>0,87	>0,69	>0,89	**<0,03**	**<0,0034**	**<0,028**	**<0,002**
Сорбированная и сорбированная универсальная	>0,55	>0,45	>0,14	>0,085	>0,17	>0,058	>0,50
Эмульсионная Montanide ISA 70 и эмульсионная Montanide ISA 206	>0,71	>0,34	**<0,05**	>0,058	**<0,031**	**<0,006**	>0,06
Эмульсионная Montanide ISA 70 и сорбированная универсальная	>0,45	>0,86	>0,09	**<0,03**	**<0,00024**	**<0,0002**	**<0,0003**
Эмульсионная Montanide ISA 206 и сорбированная универсальная	>0,57	>0,35	>0,19	**<0,021**	**<0,012**	**<0,044**	**<0,001**

Примечание: при $p \geq 0,05$ - средние значения титров антител достоверно неразличимы;

при $p < 0,05$ – средние значения титров антител достоверно различимы

В тоже время не совсем стабильна динамика отличия титров антител при иммунизации КРС эмульсионными вакцинами на основе адъювантов Montanide ISA 70 и Montanide ISA 206, что требует более детальных повторных испытаний с использованием большего числа животных.

Выводы

1. Через 7 – 14 суток после иммунизации КРС моновалентными инактивированными вакцинами из штамма вируса ящура А/Киргизия/07 с разными адъювантами достоверных различий в титрах антител в РМН не установлено.

2. Титры антител в сыворотках крови телят в РМН, начиная с 21 - 28 суток после иммунизации моновалентной инактивированной эмульсионной вакциной из штамма вируса ящура типа А/Киргизия/07 на основе адъюванта Montanide ISA 70, статистически достоверно превышают титры антител, полученные на введение сорбированной, сорбированной универсальной вакцин и эмульсионной вакцины с масляным адъювантом Montanide ISA 206.

3. Титры антител в сыворотках крови взрослого КРС в РМН, иммунизированного противоящурной моновалентной инактивированной эмульсионной вакциной на основе адъюванта Montanide ISA 70, с 21 суток после иммунизации статистически достоверно превышают титры антител, полученные на введение сорбированной вакцины, а с 35 суток - сорбированной универсальной вакцины.

Резюме: В статье представлены результаты оценки в реакции микронейтрализации (РМН) антигенной активности культуральных инактивированных моновалентных вакцин из штамма вируса ящура типа А/Киргизия/07. Установлено, что при иммунизации телят и взрослого крупного рогатого скота эмульсионной вакциной на основе масляного адъюванта Montanide ISA 70 титры антител статистически достоверно выше, чем при использовании вакцин с другими адъювантами.

SUMMARY

Results of evaluation of antigenic activity of cultural inactivated monovalent vaccines based on FMD virus strain of type A/Kirghizia/07 are presented. It was established that antibody titer was significantly higher when calves and adult cattle were immunized with emulsion vaccine based on oil adjuvant Montanide ISA 70 than if vaccines with other adjuvants were used.

Keywords: preventive vaccination, immunity, immunization, calves, cattle

Литература

1. Дудников А.И., Борисов В.В., Дудников С.А. Противоящурный иммунитет и практические достижения в области противоящурной защиты // Пробл. зооінженерії та вет. Медицини: зб. наук. прац. - Харьків, 2007. - Вип.15(40). – Ч.2, – т.1. – С. 116-120.

2. Михалишин В.В., Мамков Н.С. Адъюванты и их использование // Тр. Федерального центра охраны здоровья ж-ных. - Владимир, 2008. – Т.6. – С. 340-371.

3. Early antibody responses of cattle for foot-and-mouth disease quadrivalent double oil emulsion vaccine / P.K. Patil, J. Bayry, S.P. Nair [et al.] // J. Vet. Microbiol. - 2002 – Vol. 87.- P. 103–109

4. Evaluation of different adjuvants for foot-and-mouth disease vaccine containing all the SAT serotypes / M. Cloete, B. Dungu, L.I. Van Staden [et al] // J Vet Res. – 2008. – Vol. 75, N 1. – P. 17-31

5. Hunter P. Vaccination as a means of control of foot-and-mouth disease in sub-saharan Africa // Vaccine. – 1998. – Vol. 16, N 2-3. – P. 261-264.

Контактная информации об авторах для переписки

Кременчугская Светлана Ревдитовна,ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение» Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), 600900 г. Владимир, мкр. Юрьевец, Институтский городок, 32, кв.41, д.т. 8 (4922) 26-36-64; м.т. 89107745875; e-mail: kremenchugskaya@arriah.ru

Гуленкин В.М., ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение» Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УДК 619:572:636.22/.28

Криворучко С.В., Абакин С.С., Дубравная Г.А.

(ГНУ Ставропольского НИИ животноводства и кормопроизводства)

ВИРУС ИММУНОДЕФИЦИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ХОЗЯЙСТВАХ СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ

Ключевые слова: вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (ВИКРС), ретровирусы, реакция иммунодиффузии (РИД), полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Болезни крупного рогатого скота – важнейшая область ветеринарной науки. Большое внимание привлекала роль ретровирусов в патологии КРС. Еще в начале 70-х гг. был открыт ретровирусный возбудитель лейкоза коров (вирус бычьего лейкоза, BLV). В настоящее время этот ретровирус относят к роду дельтаретровирусов (в этой же группе находится и вирус человека ВТЛЧ). Примерно в тоже время был выделен еще один вирус КРС, роль которого в патологии окончательно не ясна до сих пор. В конце 80-х – начале 90-х гг. он был идентифицирован, как лентивирус, родственный ВИЧ и обозначен как вирус бычьего иммунодефицита (ВБИ) или вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (ВИКРС).

Впервые ВБИ был выделен из крови коровы с повышенным лимфоцитозом, прогрессирующей слабостью и истощением. При экспериментальном заражении телят у них появлялись противовирусные антитела, и развивалась гиперплазия лимфатических узлов (Flaming K.,Van der Maaten et al 1993).

Имеются только отдельные сообщения о выявлении ВБИ на территории Российской Федерации, что не позволяет сделать объективные выводы о степени его распространения в популяции крупного рогатого скота (Колотвин В.В. и др. 2006, Федоров Ю.Н., Верховский А.О., 1996). Получение информации о циркуляции вирусов в популяциях домашних животных является достаточно важным для обеспече-